OZYME Des femmes et des hommes au service de vos recherches

Taq'Ozyme Purple Mix

Mélange 2X coloré prêt à l'emploi pour la PCR et le dépôt sur gel

OZYA003-40 - 40 réactions
OZYA003-200 - 200 réactions (avec supplément de $MgCl_2$)
OZYA003-200XL - 200 réactions (avec supplément de $MgCl_2$)
OZYA003-1000 - 1000 réactions (avec supplément de $MgCl_2$)
Stockage et stabilité : **un an à -20°C ou 3 mois à +4°C**

MANUEL D'UTILISATION

BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

SOMMAIRE

BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

DESCRIPTIF

Taq'Ozyme Purple Mix est un mélange 2X prêt à l'emploi. Il facilite l'utilisation et diminue les erreurs de pipetage. Le dépôt des produits de PCR sur gel est direct. Deux colorants inertes, un rouge et un bleu sont ajoutés au mélange permettant un contrôle visuel de la distribution et le suivi de la migration en gel. Ces colorants n'interfèrent pas avec les applications en aval.

Zone de migration des colorants dans un gel d'agarose	Gel 0,5-1,5%	Gel 2-3%
Marqueur Bleu	4-10 kb	200-750 pb
Marqueur Rouge	1-2 kb	125-200 pb

PRÉCAUTIONS

- **Éviter les congélations / décongélations répétées.**
- Conserver le mélange réactionnel sur la glace jusqu'au démarrage des cycles de PCR. Cette enzyme ne convient pas à la préparation du mélange réactionnel à température ambiante. Le cas échéant, utiliser une ADN polymerase à démarrage à chaud automatique (« Hot Start » ADN Polymérase) dont l'activité est inactive à cette température. Nous recommandons la Taq'Ozyme HS (OZYA002).
- Le Taq'Ozyme Purple Mix n'est pas adapté pour des amplicons de plus 3 kb (4 kb en plasmide) ou contenant plus de 60% de GC. Si besoin voir section « Produits associés ».

LISTE DES COMPOSANTS

OZYA003-40 – 40 réactions	1 ml Taq'Ozyme Purple Mix 2X

OZYA003-200 – 200 réactions	5 x 1 ml Taq'Ozyme Purple Mix 2X
	1 ml $MgCl_2$ (25 mM)

OZYA003-200XL – 200 réactions	1 x 5 ml Taq'Ozyme Purple Mix 2X
	1 ml $MgCl_2$ (25 mM)

OZYA003-1000 – 1000 réactions	5 x 5 ml Taq'Ozyme Purple Mix 2X
	1 ml $MgCl_2$ (25 mM)

BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

COMPOSITIONS DES SOLUTIONS

	Composition du Mix 1X
KCl	10 mM
Tris-HCl	20 mM, pH 9,0
$(NH4)_2SO_4$	16 mM
Triton X-100	0,1%
$MgCl_2$	1,5 mM
dNTP	200 µM
Taq ADN polymérase recombinante	2,5 unités (dans 25 µl de mix)
Colorants	Traces de colorants rouge et bleu
Autres	Stabilisateurs d'enzymes et amplificateurs de PCR

DÉFINITION DE L'UNITÉ

Une unité est définie comme la quantité d'enzyme qui incorpore 10 nmoles de dNTP dans un fragment d'ADN en 30 min à 74°C.

PROTOCOLE STANDARD

Ce protocole est adapté pour une réaction de 50 µl à partir de matrices purifiées. Les amorces ont préférentiellement une température de fusion (Tm) proche de 60°C. C'est un point de départ pour les optimisations (voir section « Optimisations »).
Après décongélation complète de chaque réactif, bien homogénéiser à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement tous les réactifs avant leur utilisation.

1. Les réactifs sont mélangés dans un micro-tube stérile, dans l'ordre suivant :

Réactif	Volume	Concentration finale
Taq'Ozyme Purple Mix	25 µl	1X
Amorce sens (ex : 20 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Amorce anti-sens (ex : 20 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Matrice d'ADN	Plasmide : 10 ng ADNg : 200 ng ADNc non dilué§ : < 5 µl	< 500 ng/50 µl
Eau stérile redistillée	qsp* 50 µl	-
Volume final	50 µl	

*q.s.p. : quantité suffisante pour
§ : aliquot d'un mélange réactionnel de transcription inverse

2. Le mélange réactionnel est vortexé doucement, puis centrifugé brièvement pour rassembler l'échantillon au fond du tube.

BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

3. Programmation du thermocycleur :

Étape	Température	Temps	Cycles
Dénaturation Initiale	95°C	2 min	1
Dénaturation	95°C	30 sec	25-35
Hybridation	55°C*	30 sec	
Élongation	72°C	1 min§	
Extension finale	72°C	5 min	1
Stockage (option)	4°C	variable	1

* : ou Tm-5°C sur le Tm le plus bas des deux amorces, si le Tm des amorces est différent de 60°C
§ : 1 min/kb pour les amplicons > 1 kb

PROTOCOLE SPECIFIQUE

PCR sur colonies :

La Taq'Ozyme Purple Mix a été utilisée avec succès pour l'amplification d'ADN plasmidique à partir de colonies bactériennes sur milieu solide. Nous recommandons de piquer une colonie fraîche bien isolée de 1- 2 mm avec un cure-dent stérile et de resuspendre directement dans un mélange réactionnel de 50 µl final (cf. Protocole standard).

Programmation du thermocycleur pour PCR sur colonie :

Étape	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	95°C	5 min	1
Dénaturation	95°C	30 sec	25-35
Hybridation	55°C*	30 sec	
Elongation	72°C	1 min§	
Extension finale	72°C	5 min	1
Stockage (option)	4°C	variable	1

* : ou Tm-5°C sur le Tm le plus bas des deux amorces, si le Tm des amorces est différent de 60°C
§ : 1 min/kb pour les amplicons > 1 kb

OPTIMISATIONS

Préambule : tester un protocole validé pour un mélange similaire est possible et ne requiert généralement que peu d'optimisation. Nous recommandons de réaliser un gradient de température d'hybridation et de respecter le temps d'élongation du protocole standard.

Les conditions optimales diffèrent d'une réaction à l'autre et dépendent des matrices et des amorces utilisées. En premier lieu, les variables clés à optimiser dans toutes PCR sont : 1. la quantité de polymérase, 2. la température d'hybridation des amorces et 3. la concentration en magnésium. Les points 1 et 3 sont déjà optimisés dans le

BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

mélange Taq'Ozyme Purple Mix. Un chapitre a toutefois été rajouté concernant la concentration de magnésium pour les rares cas où un rajout de magnésium peut être nécessaire.

Mélange réactionnel :

Quantité d'enzyme : la quantité d'enzyme est optimisée dans le mélange Taq'Ozyme Purple Mix.

Magnésium ($MgCl_2$) : la concentration en magnésium dans le mélange Taq'Ozyme Purple Mix est de 1,5 mM. Pour certaines amorces, une augmentation de la concentration en magnésium peut être utile (jusqu'à 2,5 mM). C'est particulièrement le cas en présence importante d'EDTA (un chélateur des ions Mg^{2+}).

Concentration finale en $MgCl_2$	Volume de $MgCl_2$* (solution de 25 mM) dans 50 µl
1,5 mM	-
2,0 mM	1,0 µl
2,5 mM	2,0 µl

*$MgCl_2$ (25 mM) fourni avec le conditionnement de 200 réactions (réf. OZYA003-200)

D'une manière générale, il est recommandé d'utiliser la concentration la moins élevée possible. En effet, une surconcentration de magnésium conduit à des hybridations non spécifiques pouvant générer des produits de PCR non souhaités.

dNTP : la concentration en dNTP est optimisée dans le mélange Taq'Ozyme Purple Mix.

Matrice : la quantité optimale de matrice pour une PCR dépend essentiellement du type d'ADN. Nous recommandons pour une réaction de 50 µl :

	Plasmide (ou complexité équivalente)	ADN génomique (ou complexité équivalente)
Taq'Ozyme	1-10 ng (commencer avec 10 ng)	50-500 ng (commencer avec 200 ng)
Taq'Ozyme HS	50 pg-10 ng (commencer avec 10 ng)	5-500 ng (commencer avec 200 ng)
Taq'Ozyme Purple Mix	**1-10 ng** (commencer avec 10 ng)	**50-500 ng** (commencer avec 200 ng)

ADNc : prélever un aliquot du mélange réactionnel de transcription inverse. Le volume de celui-ci ne doit pas dépasser 10% du volume réactionnel de la PCR (5 µl pour une réaction de 50 µl).

IMPORTANT : ne pas utiliser de l'ADN solubilisé dans une solution contenant de l'EDTA (ex : tampon TE), agent chélateur des ions Mg^{2+} libres.

Amorces : la conception et la concentration des amorces sont essentielles au succès de toutes PCR. Des sites en ligne d'aide à la conception d'amorces sont très utiles. Citons Primer 3. Nous recommandons des amorces de 18 à 30 nucléotides, contenant 40-60% de GC. Dans la mesure du possible, les températures de fusion (Tm) des deux amorces doivent être le plus proche possible et aux environs de 60°C.

La méthode la plus simple pour estimer le Tm est : Tm = 2°C x (A+T) + 4°C x (G+C). Les amorces sens et anti-sens sont généralement utilisées à une concentration finale comprise entre 0.2-0.6 µM. Nous recommandons de commencer avec 0.2 µM de chaque amorce (10 pmol de chaque dans 50 µl de mélange réactionnel). Une concentration trop élevée en amorces peut diminuer la spécificité d'hybridation et induire en conséquence des amplifications non spécifiques.

Programmation du thermocycleur :

Nombre de cycles : le nombre de cycles est généralement compris entre 25 et 35 en fonction du nombre de copies de la séquence à amplifier. Augmenter le nombre de cycles ne conduit pas nécessairement à améliorer le rendement

du fragment d'intérêt. Au-delà d'un certain nombre de cycles, le bruit de fond provenant d'amplifications non spécifiques s'accroît.

Dénaturation initiale : la dénaturation initiale est nécessaire pour activer l'enzyme et dénaturer efficacement la matrice. Nous recommandons 2 minutes à 95°C. Cependant, pour les matrices plus complexes comme l'ADN génomique eucaryote, un temps de dénaturation plus long, pouvant aller jusqu'à 5 minutes peut être nécessaire.

Dénaturation : nous recommandons 30 secondes à 95°C pour l'étape de dénaturation. Cette condition convient aux matrices jusqu'à 60% de GC.

Température et temps d'hybridation : la température d'hybridation optimale dépend des amorces utilisées et de la composition du tampon de réaction. Elle est généralement 2-5°C en-dessous du Tm le plus bas des deux amorces. Dans le protocole standard, nous recommandons des amorces de Tm similaires et le plus proche possible de 60°C (voir « Amorces » dans ce chapitre). L'hybridation se fait en première instance à 55°C. Si nécessaire, réaliser un gradient de température afin de déterminer la température d'hybridation optimale (entre 45 et 68°C). Le temps d'hybridation recommandé est de 30 secondes.

Température et temps d'élongation : l'élongation se fait à 72°C. Le temps d'élongation dépend de la longueur de l'amplicon et de la complexité de la matrice. En conditions standard, nous recommandons 1 minute ou 1 min/kb pour les amplicons de plus de 1 kb. Ce temps d'élongation est généralement suffisant pour toutes les matrices. Pour les matrices de faible complexité (ex : plasmide), il peut être réduit à 30 sec/kb.

RÉSOLUTION DES PROBLÈMES

1/ Absence de produits de PCR ou rendement faible

Causes possibles	Remarques / Solutions
Omission des composants non inclus dans le mélange Taq'Ozyme Purple Mix / Erreurs de pipetage	• Vérifier la préparation du mélange réactionnel et les volumes utilisés • Vérifier les concentrations/dilutions de tous les composants
Composants défectueux	• Vérifier les conditions de stockage de tous les composants. Si nécessaire, tester chaque composant individuellement • Utiliser de l'ADN purifié. Vérifier si l'ADN est dégradé ou endommagé • Vérifier la pureté des amorces
Quantité d'ADN non optimale	• Titrer la quantité de la matrice d'ADN. Augmenter la concentration finale (voir section « Matrice » du chapitre « Optimisations »)
Concentration insuffisante de $MgCl_2$ (ex : présence d'EDTA)	• Augmenter la concentration de $MgCl_2$ (fourni avec le conditionnement 200, 200XL et 1000 rxns) par paliers de 0,5 mM
Conditions des cycles PCR non optimales	• Diminuer la température d'hybridation. Idéalement réaliser un gradient pour déterminer la température d'hybridation optimale • Augmenter le temps d'élongation, ou utiliser une enzyme mieux adaptée (voir section « Produits associés ») si la séquence cible est longue/riche en GC • Augmenter le nombre de cycles • Augmenter le temps de dénaturation particulièrement pour les matrices complexes (ADN génomique)

BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex - Tél : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - email : info@ozyme.fr

2 / Bandes multiples (« smear ») ou bandes non spécifiques

Causes possibles	Remarques / Solutions
Quantité de matrice non optimale	• Titrer la quantité d'ADN. Diminuer la concentration finale (voir section « Matrice » du chapitre Optimisations)
Conditions des cycles PCR non optimales	• Diminuer le nombre de cycles
	• Diminuer le temps d'élongation
	• Augmenter la température d'hybridation (accroît la stringence)
Concentrations d'amorces trop élevées	• Diminuer les concentrations des amorces
Contamination	• Remplacer chaque composant afin de trouver la source de contamination • Réaliser les réactions de PCR dans un espace réservé et séparé de celui dédié à l'analyse des produits de PCR
Conception d'amorces non optimal	• Désigner des nouvelles amorces (voir section « Amorces »)

PRODUITS ASSOCIÉS

- Taq'Ozyme - OZYA001-1000
- Taq'Ozyme HS - OZYA002-250 ("Hot Start")
- Emerald Amp® MAX PCR Master Mix (PCR > 5 Kb, séquences GC riches)
- ExactLadder® DNA PreMix 100 bp Plus - OZYC001-100
- ExactLadder® DNA PreMix 2 Log - OZYC002-100
- dNTP PreMix - 4 x 10 mM - OZYD001-500
- SeaKem LE Agarose - 500 g- LON50004
- AccuGENE Molecular Biology Water - 1 L - LON51200

AVERTISSEMENT

Ce produit est à usage de recherche uniquement.